The 3G Condiments, Garlic, Ginger, and Green Onion, Exhibit Synergistic Antibacterial Effects

薬味野菜による抗菌作用の相乗効果

Tatsuto Mochizuki[1], Kenichi Kawano[2], Yoshiaki Yano[2] & Katsumi Matsuzaki[2*]

望月達人[1]，河野健一[2]，矢野義明[2]，松崎勝巳[2*]

[1] Tokai High School, 1-2-35 Tsutsui, Higashi-ku, Nagoya, Aichi 461-0003, Japan
[2] Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida-shimo-adachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto, Kyoto 606-8501, Japan
* mkatsumi@pharm.kyoto-u.ac.jp

[1] 東海高等学校（〒461-0003 愛知県名古屋市東区筒井1丁目2-35）
[2] 京都大学大学院薬学研究科（〒606-8501 京都府京都市左京区吉田下阿達町46-29）
* mkatsumi@pharm.kyoto-u.ac.jp

Abstract

The recent appearance of drug-resistant bacteria is a serious emerging problem. One way to inhibit the growth of drug-resistant bacteria is to identify novel classes of antimicrobial substances. In this study, fresh food juices were screened for antimicrobial activity using the paper disk diffusion assay. Consistent with previous studies, garlic and green onion exhibited antimicrobial properties. We therefore examined the synergistic antimicrobial effects of these traditional condiment vegetables as well as ginger (3G condiments). Significant synergistic inhibitory effects were observed against gram-positive bacteria by using combinations of garlic and green onion, or garlic and ginger. Since garlic and green onion contain the same enzymes, the bioactive substance may be rapidly produced by efficient conversion of substrates in the mixture. In contrast, surfactant-like components in ginger are thought to enhance the membrane permeability of antibacterial substances derived from garlic. These results indicate the existence of reasonable synergistic antimicrobial effects in traditional combinations of condiment vegetables.

Key words: Antimicrobial activity, Condiment vegetables, Garlic, Ginger, Green onion, Synergism

要旨

近年問題となっている薬剤耐性菌の出現に対抗する方法として、新たな抗菌物質を発見することが挙げられる。本研究では、食品の絞り汁の抗菌活性をスクリーニングし、活性を示したニンニク、白ネギに加えて、ショウガを合わせた薬味野菜の相乗効果を調べた。グラム陽性菌に対し、ニンニクと白ネギで相乗効果が見られた。共通の酵素による抗菌物質の生成速度の増加が強い作用に繋がったと考えられる。また、ニンニクとショウガで見られた相乗効果では、ショウガの界面活性剤様成分が、ニンニク抗菌物質の膜透過性を高めていると考えられる。このように、薬味野菜を組み合わせることで、抗菌活性を相乗的に増強しうることが明らかになった。

重要語句：抗菌活性、相乗効果、薬味野菜、ニンニク、白ネギ、ショウガ

序論

近年、抗生物質が効かない薬剤耐性菌の出現が社会問題になっている（1）。こうした薬剤耐性菌に対抗する有効な方法の一つとして新たな抗菌作用のある物質を発見することが挙げられる。しかしながら、耐性菌に有効な新規化合物の発見には膨大な種類の化合物と研究費、時間が必要である。加えて、人体に副作用があってはならない。そこで、本研究では、人体に無害で日常的に汎用されている食品成分の中から抗菌活性作用のあるものを選出し、それらを組み合わせることで今までにない相乗効果を見出すことを目的とした。その結果３種の薬味野菜であるニンニク、白ネギ、ショウガを様々な濃度や組成で組み合わせることで、表皮ブドウ球菌に対して顕著な抗菌活性の相乗効果を発見することができた。

試料と方法

実験材料

抗菌アッセイで用いた野菜、コーヒー（抽出液）はスーパーマーケットで購入した。特に薬味野菜に関して、３－４月にかけて出荷されたニンニク（青森県産 JA）、白ネギ（鳥取県産 JA 全農とっとり「旬の香りとっとりの春」）、およびショウガ（高知県産 JA とさかみ 10「大生姜」）を用いた。野菜の抗菌成分の抽出には、イノマタ化学製（堺市、日本）のおろし器を野菜の破砕器として、また株式会社トキワ工業製（伊予三島市、日本）の「トキワのお茶パック M」を濾過フィルターとして用いた。抗菌活性測定に用いたペーパーディスク（規格：8 mm（ϕ）× 1.5 mm（T））、White Light Transilluminator TW-43（規格：100 V, 14 W, 36 × 43 cm）、デジタルノギス DT-300 は、それぞれ ADVANTEC 社（東京、日本）、UVP 社（Upland、米国）、新潟精機株式会社（三条市、日本）から購入した。菌体培養に用いた LB 培地および寒天末は、ナカライテスク社（京都市、日本）より購入した。寒天プレート容器「ノーマル型ディッシュ ST（S90-NC18 240）」と希釈系列用チューブ「プラチナチューブ 1.5 mL」はそれぞれ、アズワン株式会社（大阪市、日本）と BM 機器株式会社（東京、日本）から購入した。

実験手法

抗菌成分の抽出

野菜をおろし器ですりおろした後、濾過フィルターを通して固形物と液体成分に分離した。分離直後に、抗菌活性の有無を判断するためスクリーニングを行った。残り液を –80℃で凍結保存し、翌日に融解して相乗効果の実験を行った。

菌体の培養

本実験で用いた LB 液体および寒天培地は、断りの無い限り、全て抗生物質を含まないものを使用した。また、作業は全てクリーンベンチ内で行った。3 種類の菌体を用いて実験を行った。抗菌活性のスクリーニングには、形質転換で汎用される大腸菌株 *Escherichia coli*（*E. coli*）コンピテントセル XL1-Blue 株を用いた。XL1-Blue は大腸菌の一種であるが、プラスミドが導入しやすいように操作されている（膜構造等が弱体化している）ため、抗菌成分に対して比較的感受性が高く、スクリーニングに適していると判断した。XL1-Blue 菌液 50 μL を LB 培地 450 μL で希釈した後、すぐに寒天プレート上に均一に広げた。

抗菌活性の相乗効果実験で用いる大腸菌株 *E. coli* ATCC 25922 株および表皮ブドウ球菌株 *Staphylococcus epidermidis*（*S. epidermidis*）ATCC 12228 株の培養は以下のように行った。まず、–80℃で凍結保存されたグリセロールストックの表面を白金耳で軽く触れた後、鋸刃線を描くように LB 寒天プレート上に菌液を広げた。37℃の保温器で一晩培養した後、滅菌済の爪楊枝でシングルコロニーを LB 液体培地 5mL に植菌した。菌液の濁度が OD_{600} 値 1 以上になるまで、培養震盪機 37℃・120 rpm で培養した。菌液の濁度を測定し、OD_{600} 値 1 よりも大きい場合は LB 培地で希釈して OD_{600} 値を 1 に揃えた。

抗菌アッセイ

本実験では、抗菌アッセイとしてペーパーディスク拡散法を採用した（図 1）。抗菌作用の再現性を取るためには、均一な菌体分布を寒天プレート上に形成することが最も重要である。通常のスプレッダーでは、作業者の熟練度合によって菌体の分布が不均一になってしまうため、阻止円の大きさに再現性が得られにくく、本実験には適さなかった。高い再現性を得られる方法として、本実験では次のような方法を採用した。まず、滅菌済の綿棒（綿体積が小さいものは適さない）を、OD_{600} 値 1 に揃えた菌液に浸けた後、LB 寒天プレート上にムラなく均一に塗り広げた。60°左に回転させた後、同じように菌液を均一に塗り広げた。同様の操作をもう一度繰り返した後、菌液が蒸発するのを待った。ペーパーディスクをピンセットで摘み、野菜の抽出液に 10 秒ほど浸けた後、菌体を塗った寒天プレート上に置き、ピンセットで軽くディスクを押し付けた。1 枚のプレートにつき 4 － 7 枚程度のディスクを配置した。37℃の保温器で一晩培養した。ディスクが落ちないように、ディスク配置面を上にした。翌日、保温器からプレートを取り出し、プレートの裏面からデジタルノギスで阻止円の直径を測定した（乾燥したディスクは容易には剥がれない）。観測された直径からペーパーディスクの直径（8 mm）を差し引いた正味の直径を阻止円の大きさとした。スクリーニングでは、全ての抽出液を原液で試験した。阻止円が観られた抽出液に関しては、次に最小発育阻止濃度（MIC：minimum inhibitory concentration）を調べた。MIC は、濃度を 1/2 倍ずつ滅菌水で薄めた時に、初めて阻止円が観られなかった濃度の、直前の濃度とした。相乗効果の検定は、各薬味野菜の最小発育阻止濃度以下で行った。同じプレート上のディスクは、染み込ませた抽出液の種類が異なるだけで、終濃度は全て同じに揃えた。

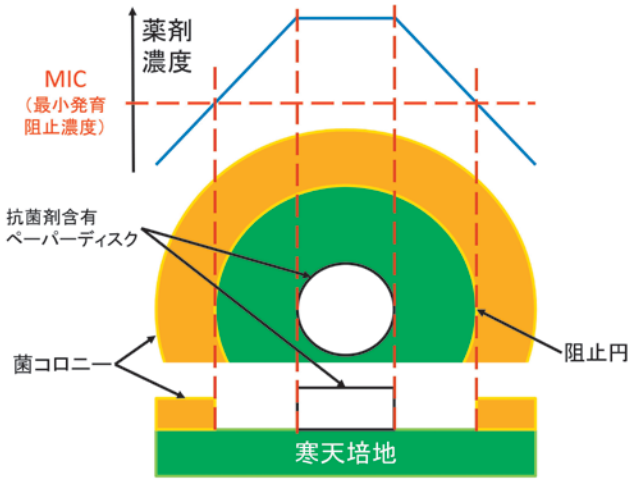

図 1. ペーパーディスク拡散法原理．ペーパーディスク拡散法では，植菌した培地の上に抗菌活性を調べたい物質の溶液を浸透させたペーパーディスクを置く．一晩、菌を培養させると，その物質に一定以上の抗菌活性があれば菌コロニー（黄色）のできない阻止円が形成される．この阻止円の有無と直径を調べることで抗菌活性を調べることができる．

結果

スクリーニング

今回、食品に関してペーパーディスク拡散法を用いてスクリーニングをおこなった（表 1）。ニンニクと白ネギに抗菌活性が見られた。白ネギに比べて、ニンニクの方が抗菌性が高いことが言える。

表 1. *E. coli*（XL1-Blue 株）を用いたスクリーニングサンプルと阻止円正味の直径．

通し番号	サンプル	濃度 [1]	正味直径 [2]
1	エリンギ	原液	0.00 mm
2	ガラムマサラ	原液	0.00 mm
3	キウイ	原液	0.00 mm
4	ショウガ	原液	0.00 mm
5	ダイコン	原液	0.00 mm
6	デコポン	原液	0.00 mm
7	トウガラシ	原液	0.00 mm
8	トマト	原液	0.00 mm
9	ニンニク	原液	25.4 mm
10	白ネギ	原液	4.70 mm
11	ブナシメジ	原液	0.00 mm
12	ホウレンソウ	原液	0.00 mm
13	ミカン	原液	0.00 mm
14	コーヒー抽出液（キリマンジャロ）	原液	0.00 mm

[1] 濃度欄における「原液」とは，食品をすりおろした液体部分を希釈せずに用いたことを示す．ただし，コーヒーに関してはコーヒー豆をすりおろしたのではなく，熱湯から抽出した可溶化成分を用いた．スクリーニングで原液を用いた理由はできるだけ小さい抗菌活性も探す目的と揮発成分も含めて調べる目的によるものである．

[2] 抗菌活性の見られる直径からディスクの直径を差し引いたものを「正味直径」と定義する．1 回の実験結果を示す．

各薬味野菜の最小発育阻止濃度（MIC）の決定

相乗効果の実験には、ニンニク、白ネギ、ショウガの３種の薬味野菜を選出した。上記のスクリーニング実験ではニンニクと白ネギのみに抗菌活性が認められたが、同じ薬味として汎用されているショウガは、単独では抗菌活性が認められなかったものの、ニンニクと白ネギ、もしくはその両方と混ぜ合わせた時に相乗効果が発揮させることを期待して残した。相乗効果を調べる前に、各薬味野菜単独での MIC を決定した。これは、各野菜の単独での MIC 以下の濃度で抗菌活性を調べないと相乗効果の有無が判断できないからである。

代表的なグラム陰性菌と陽性菌としてそれぞれ大腸菌 *E. coli*（ATCC 25922 株）と表皮ブドウ球菌 *S. epidermidis*（ATCC 12228 株）を用いた。滅菌水を用いてニンニク、白ネギ、ショウガの希釈系列を作製した。*E. coli*（ATCC 25922 株）では、ニンニクに対して希釈濃度 1/64 で初めて阻止円が認められなかったことから MIC は 1/32 とした（図 2A）。一方、白ネギとショウガに関しては原液でも阻止円が見られなかった（図 2B, C）。*S. epidermidis*（ATCC 12228 株）では、ニンニクと白ネギに対して、それぞれ希釈濃度 1/24 と 1/2 で初めて阻止円が認められなかったことから、MIC はそれぞれ 1/12、1 とした（図 2D, E）。一方、ショウガに関しては原液でも阻止円が認められなかった（図 2F）。

相乗効果の検定

各薬味野菜の MIC の値からショウガと白ネギの終濃度を MIC より低い希釈濃度 1/3 に固定した（3 種類の溶液をそれぞれ等量混ぜ合わせるので、原液を用いた場合は必ず終濃度は 1/3 になる）。ニンニクの終濃度を MIC 以下に設定して、それらの混合 7 パターン（各薬味野菜単独× 3 パターン、2 種混合× 3 パターン、3 種混合× 1 パターン）について阻止円の大きさを調べた（図 3C）。

E. coli（ATCC 25922 株）においては、ニンニクの希釈濃度を MIC である 1/32 にしたときには、ニンニクを含むどの条件でも阻止円が認められた（図 3A）のに対して、ニンニクの希釈濃度を 1/64 に下げたときはすべての条件で阻止円が認められなかった（図 3B）。一方、*S. epidermidis*（ATCC 12228 株）においては、ニンニクの希釈濃度を MIC である 1/12 にしたときには、ニンニク単独時と白ネギとショウガと共存したときには有意差はなかった（図 3D）。興味深いことに、ニンニクの MIC よりもさらに希釈した濃度（1/24，1/48）にはニンニク単独では抗菌活性が見られなかったのに対して、白ネギやショウガの共存下では顕著な活性が示された（図 3E, F）。

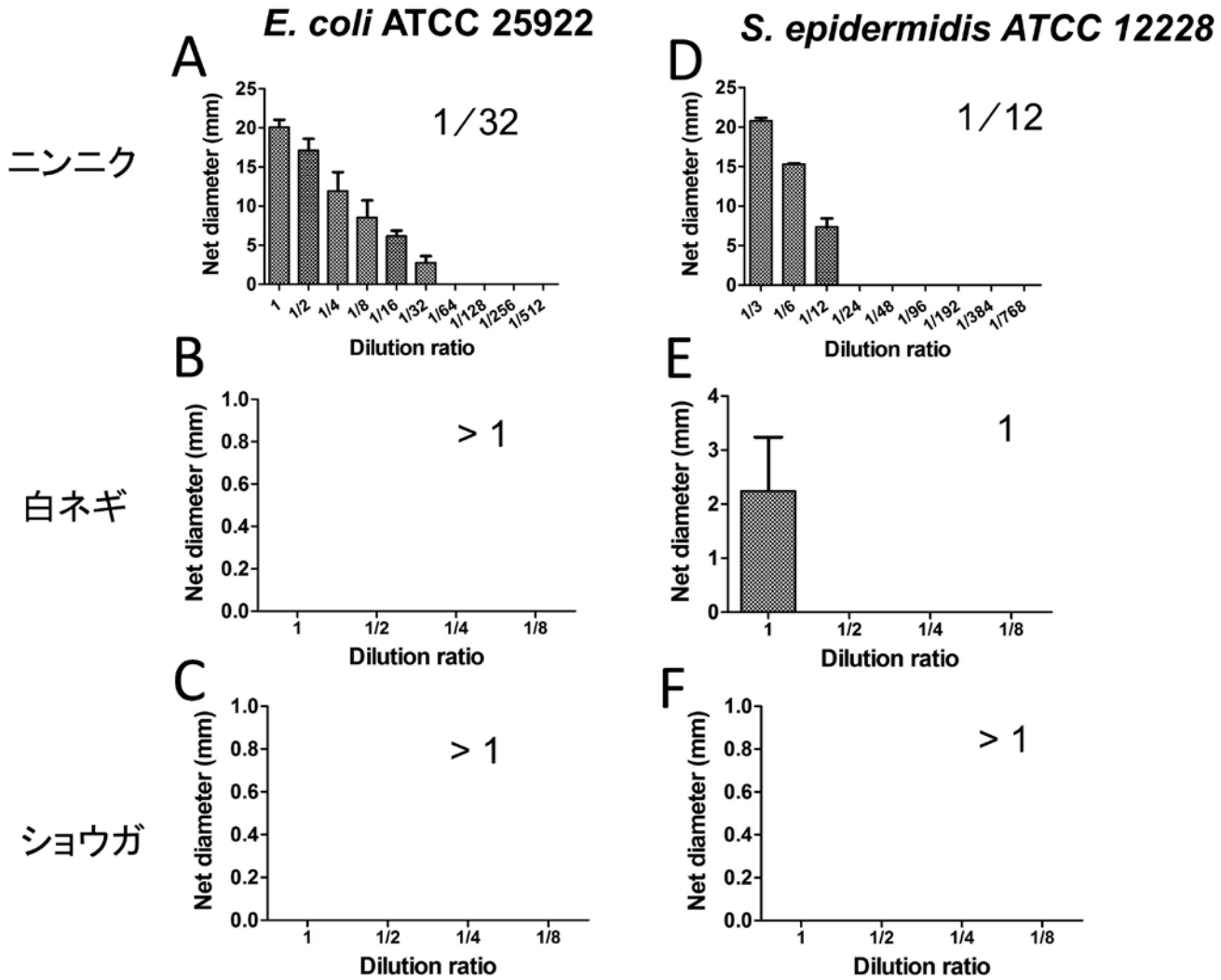

図 2. 各薬味野菜濃度別阻止円正味直径と MIC．濃度は原液に対する希釈割合を示す．各結果は 2 回の実験の平均値と標準偏差を示す．各グラフの右上の値は MIC を示す．MIC で “>1” とは原液でも阻止円が見られなかったことを示す．

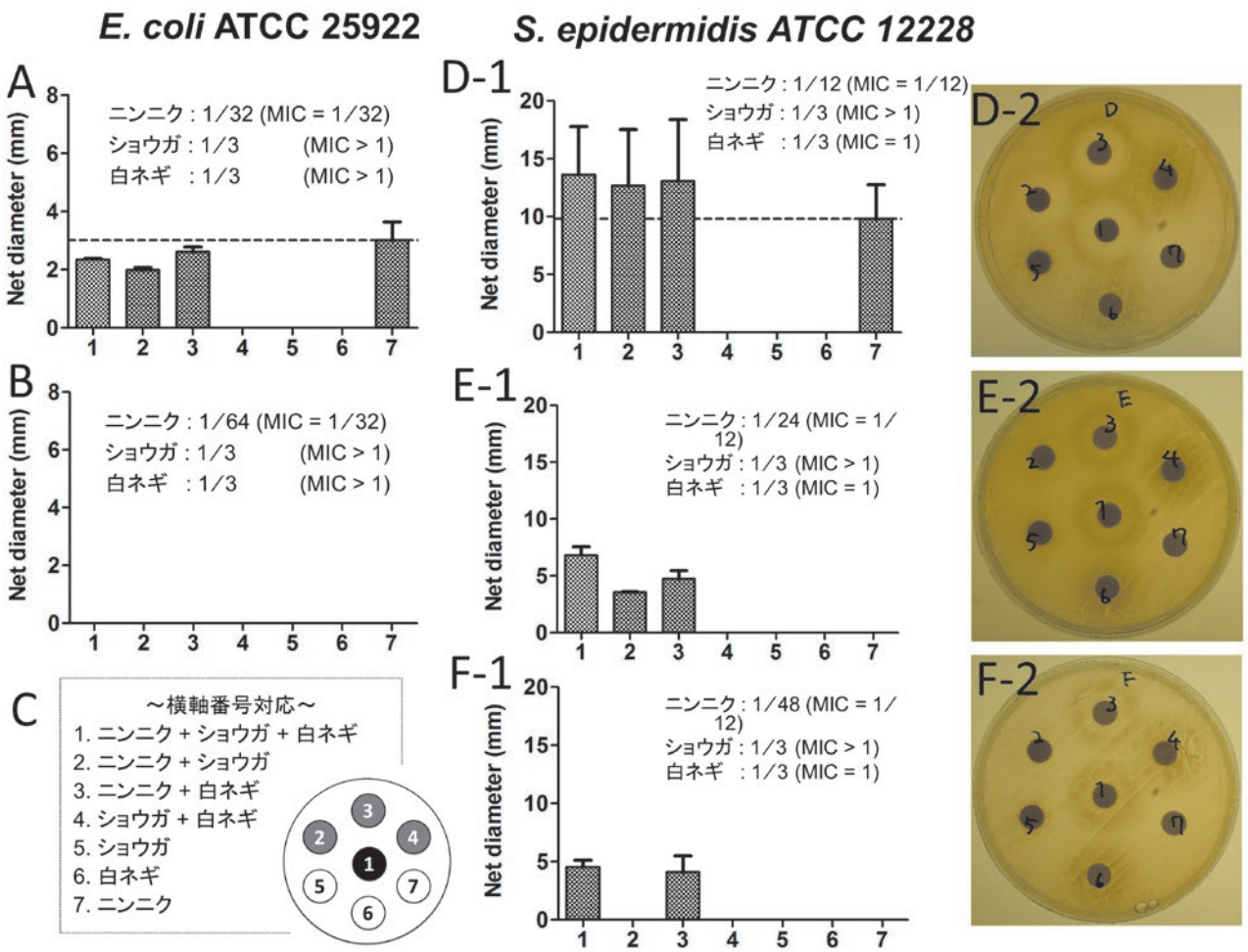

図 3. 薬味野菜複数混合濃度別阻止円正味直径と MIC. 各結果は 2 回の実験の平均値と標準偏差を示す.
D-2, E-2, F-2 はそれぞれ D-1, E-1, F-1 条件での阻止円写真を示す.

既存の抗生物質との活性比較

最後に、代表的な抗生物質であるアンピシリンの阻止円の大きさと比較して、*S. epidermidis* に対するニンニク（濃度：1/12）、白ネギ、ショウガの抗菌活性の相乗効果を見積もった。*S. epidermidis* に対するアンピシリンの MIC は 5 μg/mL であった（図 4）。ニンニク・白ネギ・ショウガ存在下での阻止円の正味直径（図 3E）から考慮して、その活性はアンピシリン 20 μg/mL に相当する。

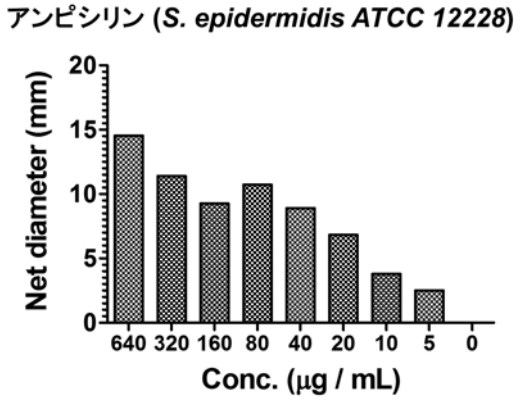

図 4. アンピシリン濃度別阻止円正味直径. 1 回の実験結果を示す.

考察

今回、*E. coli*（ATCC 25922 株）では薬味野菜の抗菌活性の相乗効果は認められなかったが、*S. epidermidis*（ATCC 12228 株）では認められた。そこで次のような考察を行った。

ニンニク・白ネギ相乗効果

図 5 に示すようにニンニクと玉ネギにはそれぞれアリインとイソアリインが含まれており、いずれもニンニクと玉ネギがもつ産生酵素アリナーゼによって抗菌活性物質アリシンが生成されることが知られている（2）。今回、ニンニク単独では *E. coli* と *S. epidermidis* で抗菌活性が見られ、玉ネギと同じユリ科の白ネギ単独で *S. epidermidis* に対して抗菌活性が見られたのはアリシンの抗菌力によるものだと考えられる。しかしながら、アリシンは強力な抗菌性化合物である一方、構造的には不安定であるため、分解速度が速い。従って、アリシンの生成速度が抗菌作用に大きく関与しうる。ニンニクと白ネギを混合することで相乗効果が見られたのは、両者共存下では産生酵素アリナーゼとその基質の濃度積が大きくなることで、アリシンの生成速度が増加したためと考えられる。

ニンニク・ショウガ相乗効果

ショウガには [10]- ジンゲロールという疎水基と親水基を持つ界面活性剤のような構造をしている化合物が含まれる（図 5）。[10]- ジンゲロールは界面活性剤に似たような働きで細胞

膜を乱すのではないかと考えられている（3）。この [10]- ジンゲロールの働き自体は細胞死には繋がらないので、ショウガ単独では抗菌活性が見られなかったが､ニンニクと共存した場合、[10]- ジンゲロールの働きによって抗菌活性をもつアリシンの細胞内への浸透性が高まり、その結果、抗菌活性の相乗効果が見られたと考えられる。

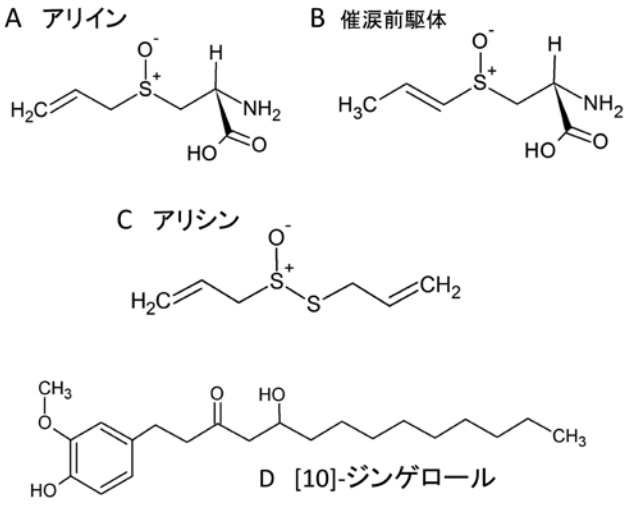

図 5. 抗菌性化合物とその前駆体の化学構造式。

菌種別効果

今回、グラム陰性菌である *E. coli* では抗菌活性の相乗効果は認められなかったが、グラム陽性菌である *S. epidermidis* では認められた原因としてはグラム陰性菌には外膜が存在するためだと思われる。事実、膜構造が弱体化している XL1-blue では相乗効果が観察された（data not shown）。

結論

本実験により、ペーパーディスク拡散法を用いてグラム陰性菌である *E. coli* では薬味野菜の抗菌活性の相乗効果は見られなかったが、グラム陽性菌 *S. epidermidis* では相乗効果が認められた。ニンニクと白ネギは同じアリシン産生酵素であるアリナーゼを共有しているため、混合により効率よく基質と反応して抗菌活性物質アリシンが生じやすくなったと考えられる。ニンニクとショウガの組み合わせではショウガに含まれる［10］- ジンゲロールが膜弱体化を行うことによって、抗菌活性物質の膜透過性が促進したと考えられる。グラム陽性菌で抗菌活性の相乗効果が見られ、グラム陰性菌で抗菌活性の相乗効果が見られなかったのは膜の構造の違いに起因すると思われる。薬味野菜を生魚や生肉と共に食べる事は、風味だけでなく食中毒予防の観点からも意義があると考えられ、古来より利用されてきたが、本研究の結果は、薬味野菜を複数組み合わせることで、その抗菌活性を相乗的に増強させうることを示している。

謝辞

上山和輝さん、山本麻実さんには抗菌アッセイの準備、操作をお手伝いいただきました。この場を借りて謝辞を述べさせていただきます。

参考文献

1. 公益社団法人日本薬学会．新規抗菌薬の開発に向けた 6 学会提言．<http：//www.pharm.or.jp/hotnews/archives/2014/0520.html> [accessed 04 Jun. 2015]. (2014).
2. Block, E. The chemistry of garlic and onions. Sci. Am. 252: 114–119. (1985).
3. Nagoshi, C., S. Shiota, T. Kuroda, T. Hatano, T. Yoshida, R. Kariyama & T. Tsuchiya. Synergistic effect of [10]-gingerol and aminoglycosides against vancomycin-resistant Enterococci (VRE). Biol. Pharm. Bull. 29: 443–447. (2006).